

AP20 Rec. CH/TO 11 JUL 2006

反复自然流产的治疗药物及治疗方法技术领域

本发明涉及一种治疗反复自然流产的药物和方法。

背景技术

流产是妊娠 28 周前，胚胎及其附属物被孕妇体内排除的现象。根据流产发生时间，12 周以前发生者称为早期流产，12 周以后发生者称为晚期流产。根据发生原因分为自然流产和人工流产两类，人工流产是指通过手术或药物终止妊娠的方法；自然流产是指没有人工干预，由于某种疾病引起的妊娠终止，包括偶然自然流产和反复自然流产两类。

反复自然流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA) 是指连续 2 次以上在同一妊娠周内发生胎停育继而流产的现象。在孕妇中反复自然流产的发病率为 2-3%。根据流产发生的时间，可分为早期 RSA 和晚期 RSA；根据流产前有无正常怀孕史，可分为原发性 RSA 和继发性 RSA。临床上将两种分类结合起来，将 RSA 分为：早期原发 RSA，晚期原发 RSA，早期继发 RSA 和晚期继发 RSA。

多种病因可以引起反复自然流产，其中有染色体异常、内分泌失调、生殖器官解剖结构异常、细菌或病毒感染、母婴血型不合、环境污染等。但还有一半左右的反复自然流产没有明确病因，被称为不明原因的反复自然流产 (unexplained RSA)。近年来随着对生殖免疫机制认识的深入，以及免疫学检查方法的进步，免疫因素被认为是不明原因反复自然流产的主要病因 [Ksouri H, Zitouni M, Achour W, Makni S, Ben Hassen A., Recurrent pregnancy loss related to immune disorders, Ann Med Interne (Paris). 2003 Sep;154(4):233-47.]。与免疫因素有关的 RSA 被称为免疫性 RSA。

流行病学调查显示早期继发 RSA 多为免疫性 RSA。

关于引起 RSA 的免疫学机制，几种代表性观点如下：(1) 夫妇

HLA 的相容性高 (increased sharing of human leukocyte antigens (HLA)), 抑制母体产生抗配偶细胞毒性抗体 (anti-paternal cytotoxic antibodies, APCA)、抗个体基因型抗体 (anti-idiotypic antibodies, Ab2)、混合淋巴细胞反应阻断抗体 (mixed lymphocyte reaction blocking antibodies, MLR-Bf) 等阻止母亲免疫系统对胚胎攻击的封闭抗体 (blocking antibodies, BA); (2) 辅助 T 细胞 1 (Th1) 来源的细胞因子和自然杀伤细胞的 (natural killer cells, NK) 过度活化 (Overactivity of T helper-1 (Th-1) cytokines); (3) 抗磷脂抗体 (antiphospholipid antibodies APA) 水平的异常增高: 抗磷脂抗体是一组自身免疫性抗体, 其中包括抗心磷脂抗体、狼疮抗凝抗体 (i.e., lupus anticoagulants and anticardiolipin [aCL] antibodies) 等。

由于对母体和胎儿之间的免疫相容机制缺乏透彻的了解, 现在对反复自然流产的免疫学发病机制还没有准确的认识, 至今还没有疗效十分确定的治疗方法。现在应用比较广泛的免疫性 RSA 的治疗方法是淋巴细胞免疫治疗。自 Taylor 和 Faulk 于 1981 年首次给不明原因 RSA 患者输注取自配偶的混合白细胞悬液后, RSA 的免疫治疗在国内外均已开展 [Gatenby PA, Cameron K, Simes RJ. Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: results of a controlled trial. Am J Reprod Immunol. 1993 Mar;29(2):88-94.]. 免疫原多采用丈夫的淋巴细胞。方法为: 从配偶的静脉血中分离提取淋巴细胞, 皮内注射; 也可以用丈夫的浓缩白细胞或全血进行静脉注射; 如果先用 200radX 射线照射灭活细胞再行皮内注射, 可减少抗宿主反应。通常在妊娠前免疫 2~4 次, 每次间隔 2 周, 妊娠后加强免疫 1~3 次。在淋巴细胞免疫治疗 RSA 开展 20 年后的今天, 经国内外学者大量研究, 发现该治疗方法治疗效果不确定, 副作用大。有学者检索了 1981~1994.9 间发表的大部分 RSA 免疫治疗的文献, 发现有严格实验对照和具有分析价值的 6 份研究结果中中仅一份显示 RSA 免疫治疗有效, 其余研究中治疗组与对照组相比无统计学差异 (颜建化、朱锡华, 论反复自然流产免疫治疗的科学性与

研究对策, 科学, 1994.6: 59-62)。Charles A. Omwandho 等 (Recurrent Pregnancy Losses and the Role of Immunotherapy. Review Article, Arch Gynecol Obstet (2000) 264:3-12)发现, 虽然一些实验数据看起来支持淋巴细胞免疫治疗的有效性, 但与用非免疫方法例如心理支持、关爱等治疗的对照组相比, 临床治愈率没有统计学差异。用失活的细菌或融血后 UV 照射的自身血液对 RSA 患者进行免疫治疗, 取得了同样高的治愈率。这些实验结果置疑了淋巴细胞免疫治疗的有效性。

此外, 淋巴细胞治疗有一些严重的副作用, 例如红细胞致敏、血小板减少、胎儿宫内生长迟缓等。而且由于该方法使用的是具有完整核物质的活细胞, 因此一些通过血液传播的疾病如 AIDS 等可以从一个个体转移到另一个个体。

因此, 本领域迫切需要一种疗效确切、副作用小的针对免疫性 RSA 的治疗方法。

本发明人在对免疫性早期继发 RSA 的发病机理的深入研究基础上, 建立了一种高效、安全的 RSA 免疫治疗方法。

发明概述

本发明提供:

1) 一种用于治疗个体反复自然流产的药物组合物, 其特征在于含有治疗有效量的来自所述个体配偶的 2 号染色体或其含有纤连蛋白 (fibronectin, FN) 编码基因的片段。

2) 一种用于治疗个体反复自然流产的药物组合物, 其特征在于其含有治疗有效量的来自多个男性个体的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段的混合物。

3) 作为药物的男性 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

4) 能够降低体内抗核抗体水平的物质、特别是来自男性的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段在制备治疗反复自然流产的药物中的应用。

5) 一种治疗个体反复自然流产的方法, 其包括给予需要治疗的个体治疗有效量的能够降低体内抗核抗体水平的物质。

6) 根据上述 5) 的治疗方法, 其中所述能够降低体内抗核抗体水平的物质是来自所述个体配偶的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

7) 根据上述 5) 的治疗方法, 其中所述能够降低体内抗核抗体水平的物质是来自多个男性个体的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段的混合物。

本发明提供的 RSA 治疗药物组合物和治疗方法经临床验证, 疗效确切 (有效率在 95% 以上), 未发现明显副作用。

发明详述

本发明人对早期继发 RSA 进行了临床流行病学研究, 发现在多种相关因素中人流与早期继发 RSA 的相关性最高, 并且其中大多数继发自然流产发生的妊娠周与人流的妊娠周相同或相近, 与对照组相比具有显著的统计学差异 (结果见表 1)。因此, 本发明人推测人流是早期继发 RSA 的诱因。

表 1 早期继发 RSA 的流行病学调查

项目	病例数 (N)	人流		时间一致	
		例数	百分比 (%)	例数	百分比 (%)
RSA	35	32	91	30	86
对照	140	28	20	—	—
x 2		52.4			
P		<0.01			

为了探询早期继发 RSA 的发病机制, 本发明人对有人流病史的早期继发 RSA 患者的再次怀孕进行监测, 当发现胚胎停育后, 通过药物流产获得具有完整胎盘绒毛的 RSA 胚胎标本。无反复自然流产患者药物流产所获得的胚胎标本作为对照。对所获得的胚胎绒毛组织

进行显微水平和超微水平的观察，并进行免疫组化研究。结果发现，在光镜下这两种绒毛结构没有差别，但在电镜下，对照标本的滋养层细胞外有一层致密的蛋白网结构，而 RSA 患者标本的滋养层细胞是裸露的（结果见图 1 和图 2）。免疫组化显示，对照标本的滋养细胞层与蜕膜之间存在纤连蛋白带，并且滋养细胞之间也存在纤连蛋白带，而 RSA 患者标本的滋养层细胞外没有纤连蛋白。因此本发明人认为滋养细胞层外的纤连蛋白带是构成胎盘免疫屏障的主要结构，该纤连蛋白带缺失所导致的免疫屏障功能破坏是免疫性 RSA 的病因。

为了研究免疫性 RSA 患者滋养细胞层外的纤连蛋白带缺陷的原因，本发明人用检测纤连蛋白抗体的试剂盒检测了 30 例有人流病史的早期继发 RSA 患者血清中的抗 FN 抗体，结果与对照组相比无统计学差异。但令人惊异的是，本发明人发现这些患者血清中抗 2 号染色体（含 FN 编码基因）的抗核抗体水平（按实施例 2 所述方法测定）与对照组相比明显升高（见表 2）。

因此本发明人对免疫性 RSA 的发病机制提出如下假说：在对妊娠进行人工干预例如人工流产的过程中，胚胎细胞破裂，配偶来源的处于表达状态的 FN 编码基因作为抗原被递呈给母体的免疫系统，产生抗 FN 编码基因的抗核抗体。与同一配偶再次怀孕时，抗 FN 编码基因的抗核抗体进入滋养细胞，与处于表达状态的 FN 基因结合，封闭该基因，使胚胎滋养层细胞外的纤连蛋白不能正常形成，胎盘免疫屏障的完整性被破坏，从而母体对胚胎产生排斥反应，胚胎停止发育，流产发生。

FN 是一种大分子多功能糖蛋白，存在于结缔组织、细胞表面、细胞浆和其它体液中。已有研究发现胚胎滋养细胞外存在 FN 带，但认为它仅在胎盘与蜕膜的连接[Ronald F. Feinberg, Harvey J. Kliman, and Charles J. Lockwood, Is Oncofetal Fibronectin a Trophoblast Glue for Human Implantation? American Journal of Pathology, Vol. 138, No. 3, March 1991]、滋养细胞在蜕膜中的移动和侵袭中起作用[Chakraborty C, Gleeson LM, McKinnon T, Lala PK., Regulation of human trophoblast

migration and invasiveness. Can J Physiol Pharmacol. 2002 Feb; 80(2):116-24. Review.]. 还有研究认为检测孕妇宫颈分泌物中的 FN 水平能够预测早产 [Koenn ME., Fetal fibronectin, Clin Lab Sci. 2002 Spring;15(2):96-8, 115]. 但现有技术对于 FN 在胚胎免疫屏障中的作用没有明确的认识。1995 年通过放射自显影技术证实了人类 FN 基因位于 2 号染色体长臂 3 区 4 带 (2q34)。

本发明人在上述对免疫性 RSA 发病机制的研究基础上, 进行了进一步的深入研究, 试图寻找对免疫性 RSA 的有效治疗方法。结果惊人地发现, 给免疫性早期继发 RSA 患者怀孕前注射配偶来源的含 FN 编码基因的 2 号染色体, 可以有效地降低患者外周血中抗 2 号染色体的抗核抗体水平 (表 2)。更令人惊异的是, 通过孕前和/或孕中显著降低所述抗核抗体水平, 可以使免疫性 RSA 患者正常妊娠和生育。

表2 治疗前后免疫性RSA患者血清抗核抗体水平的变化

	人数	外周血抗核抗体平均值	组间差异
染色体治疗前	35	1: 254.7	
染色体治疗后	35	1: 34.6	
对照组	45	1: 38.9	P<0.01

因此, 本发明证明了免疫性反复自然流产与患者体内的抗核抗体水平直接相关, 可以通过降低体内的抗核抗体水平来治疗免疫性反复自然流产。

因此, 本发明因此提供一种治疗个体反复自然流产的方法, 其包括给予需要治疗的个体治疗有效量的能够降低体内抗核抗体水平的物质。所述能够降低体内抗核抗体水平的物质例如可以是来自待治疗个体之配偶的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段, 或者来自多个男性的 2 号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段的混合物。根据本发明的方法, 免疫性 RSA 个体的抗核抗体水平可以被降低并在一定时期内维持在一个妊娠安全水平。该个体在此安全水平下受孕并度过妊娠早期即可能完成正常妊娠。

相应地，本发明涉及能够降低体内抗核抗体水平的物质在制备治疗反复自然流产的药物中的应用。所述能够降低体内抗核抗体水平的物质特别是来自男性的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。所述2号染色体或其片段可以是来自待治疗个体的配偶，或者是来自多个男性个体的2号染色体或其片段的混合物。

本发明还提供一种用于治疗个体反复自然流产的药物组合物，其特征在于含有治疗有效量的来自所述个体配偶的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段，或者含有治疗有效量的来自多个男性的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段混合物。

经临床使用证明，本发明的药物组合物和治疗方法可以有效地治疗免疫性RSA。

在本发明的一个优选实施方案中，使用分离的、完整2号染色体。

在本发明的另一优选实施方案中，使用从M期细胞分离的2号染色体。

虽不拘于任何理论，但本发明人认为，由于免疫性RSA患者体内抗FN编码基因的抗核抗体水平增高使胚胎滋养层细胞外的FN带不能正常形成，因此给患者注射能够降低体内抗核抗体水平的物质使其水平降低（例如注射配偶来源的含FN编码基因的2号染色体作为抗原中和相应抗核抗体），而不足以封闭正在表达的FN基因。这样，妊娠时胚胎的FN编码基因能够正常表达，在滋养层细胞外形成FN带，胚胎免疫屏障形成良好。使得胚胎能够渡过既往流产妊娠周，正常发育成熟。

在本发明药物组合物的一个实施方案中，使用治疗有效量的来自多个男性个体的2号染色体或其片段的混合物。在本发明的该实施方案中，所述多个男性个体的数量例如至少为约3，优选至少为约5，更优选为约10、20、30或更多。同样，本发明涉及作为药物的来自多个男性个体的2号染色体或其片段的混合物，所述混合物在制备治疗RSA药物中的应用，以及通过给予患者有效量的该混合物治疗RSA的方法。

本发明所述下列概念具有如下含义：

个体（患者）：指包括人的任何哺乳动物雌性个体。

配偶：指RSA个体的流产妊娠的性伙伴。

2号染色体：指人的2号染色体或其他哺乳动物中含FN编码基因的
5 类似染色体。对后一种情况而言，所述染色体在动物染色体组中的编号不一定是2号，只要其含有FN编码基因即可。

抗核抗体：指抗各种细胞核成分的抗体，特别是按类似于实施例2的方法测定的抗体。

免疫性RSA：指血清中抗核抗体滴度大于1：64的早期继发性反
10 复自然流产。

抗体滴度（水平）：指按ELISA法测定抗体阳性的样品血清的最大稀释度。

妊娠安全水平：指比RSA患者原抗核抗体水平降低至少约30%、
15 优选至少约40%、更优选至少约50%、60%、70%或以上的抗核抗体水平，或者指抗体滴度小于约1：64。

分离的：指2号染色体与其他细胞物质（包括蛋白质、其他染色体等）相分离。以干物质计，优选其它细胞物质的含量在10wt%以下，
20 优选其他细胞物质的含量在10wt%以下，更优选在5%、4%、3%、2%、甚至1wt%以下。优选其他染色体的含量<10%，更优选<1%。

M期（mitosis phase）：从细胞分裂开始到结束的时期。

染色体片段：含纤连蛋白的编码基因并保留降低本发明抗核抗体水平之活性的2号染色体的片段。

本发明的药物组合物或方法中，可以使用含有2号染色体或其染色体片段的染色体混合物，例如除去了其他细胞成分的全部染色体的
25 混合物。但如上所述，本发明优选使用分离的2号染色体或其片段。

本发明药物组合物中的2号染色体可以来自任何种类的体细胞，
优选外周血淋巴细胞。外周血淋巴细胞可用本领域技术人员熟知的方法分离。优选在分离染色体之前将来源细胞如外周血淋巴细胞在体外培养一段时间。例如，用常用的细胞培养液如RPMI-1640或DMEM培

养液以及胎牛血清在5% CO₂、37℃±0.5℃细胞培养箱中培养淋巴细胞一段适宜的时间，通常为3到5天。在所述细胞培养期间，可以在培养液中加入适量的秋水仙素、秋水仙酰胺或长春花碱等能够阻止微管形成的试剂，优选秋水仙素，阻止细胞有丝分裂（mitosis），使细胞停止在M期。可以通过本领域技术人员熟知的化学或物理方法如细胞冻融、碱性细胞裂解液、低渗法等使细胞破裂，提取全部染色体。优选的方法是低渗法。可以利用本领域技术人员熟知的方法如密度梯度离心法进一步分离提取完整的2号染色体，或通过酶切将含FN编码基因的染色体片段剪切下来并纯化。优选染色体或染色体片段在提取后马上用来配制制剂，也可以通过本领域技术人员熟知的方法制成冻干粉，低温如-70℃储存备用。

本发明药物组合物通常被制成注射剂。该注射剂可以按常规方法利用常规无菌注射用水或生理盐水等载体与适宜量的2号染色体或其含FN编码基因的染色体片段混合来制备。对于该制剂中2号染色体或其片段的浓度没有特别限制，只要最终制剂适合皮下注射即可。例如该浓度为约2-15条染色体/油镜视野，优选5-10条染色体/油镜视野，更优选10条染色体/油镜视野。用本发明药物组合物治疗免疫性RSA时，一般通过表皮下注射给药，优选上臂表皮下注射。每个疗程的注射剂量和注射次数可以由临床医生确定，以使患者外周血抗核抗体水平降低至妊娠安全范围。例如每次注射0.5到2ml含上述浓度2号染色体或其片段的注射剂，每个疗程通常注射3到5次，优选4次，30天内完成。一个疗程结束后，测定外周血抗核抗体的水平，如果降至妊娠安全范围即可受孕。例如一个疗程后抗核抗体妊娠安全水平可以保持约3个月，在此期间可以安全受孕。优选地，怀孕后再进行一个疗程，以巩固治疗效果。

本发明的药物组合物和治疗方法已在临床试用，共治疗300余例患者，治愈率超过95%，至今未发现副作用。作为治疗免疫性RSA的新方法，下面将本发明基因免疫疗法与已有的淋巴细胞免疫疗法进行比较（表3）。

表3 本发明免疫疗法与淋巴细胞免疫疗法的比较

	本发明免疫疗法	淋巴免疫治疗
治疗方法	制备染色体疫苗，皮下注射脱敏	输入淋巴细胞
临床效果	确定，> 95%	无显著治疗效果
副作用	目前还没有发现明显的副作用	<ul style="list-style-type: none"> - 输血反应 - 自身免疫疾病 - 红细胞和血小板超敏 - 感染 - 胎儿宫内生长滞缓 - 宿主移植免疫疾病 - 血小板减少症 - 新生儿死亡
血液感染风险	极低	高
副作用发生率	极低	高

下面结合附图和具体实施例进一步描述本发明，但本发明的范围并不受这些附图和实施例的限制。

附图简述

图1. 电镜观察显示正常对照胎盘标本的滋养层细胞外有一层致密的蛋白网结构。

图2. 电镜观察显示RSA患者胎盘标本的滋养层细胞是裸露的。

本发明的具体实施方案

实施例 1

早期继发RSA胚胎绒毛外纤连蛋白带的缺失

(1) 对有人流病史的早期继发RSA患者再次怀孕进行监测，当发现胚胎停育后，通过药物流产获得具有完整胎盘绒毛的RSA胚胎标本。

(2) 无反复自然流产病史的患者药物流产所获得的胚胎标本作为对照。

(3) 将胚胎标本用中性10%福尔马林固定、脱水、石蜡包埋，切成4~5 μm厚的组织切片，HE染色，光学显微镜下观察。发现两种胚胎组织的镜下结构没有明显差异。

(4) 将所获得的新鲜胚胎标本用2.5%戊二醛固定，常规方法制成电镜切片，透射电镜观察。发现对照标本的滋养层细胞外有一层致密的蛋白网结构，但RSA患者标本的滋养层细胞是裸露的。结果见图1和图2。

(5) 用鼠抗人FN单克隆抗体(购自DAKO公司，1:50专用抗体稀释液稀释)，以DAB为显色底物，常规免疫组化方法检测两种胚胎标本纤连蛋白的表达。结果显示对照标本的滋养细胞层与蜕膜之间存在纤连蛋白带，并且滋养细胞之间也存在纤连蛋白带；而RSA患者标本的滋养层细胞外纤连蛋白带缺失。

实施例2

测定早期继发RSA患者外周血抗核抗体的水平

(1) 制备来自多名普通男性个体的2号染色体混合物，男性个体数通常>20名。

(2) 用包被缓冲液(0.05M碳酸钠缓冲液，PH9.6)稀释2号染色体混合物至浓度为10条染色体/油镜视野，包被聚苯乙烯微量塑料板(酶标板)。

(3) 向每个反应孔中加入用稀释缓冲液(含0.1%牛血清白蛋白的PBS缓冲液(PH7.4))按不同比例(1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024)稀释的患者血清稀释液50微升，37℃下反应30分钟，用PBS缓冲液(PH7.4)洗涤2次。

(4) 向每个反应孔中加入辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgG抗体(购自DAKO公司)50微升，37℃反应30分钟，然后用PBS缓冲液(PH7.4)洗涤2次。

(5) 向每个反应孔中加入常规方法新鲜配制的 TMB (3,3',5,5' 四甲替联苯胺) 底物溶液 0.1ml, 37℃反应 10 到 30 分钟。

(6) 用酶标仪读取每个反应孔的 OD 值, 以测定抗核抗体水平; 或者以肉眼可观察到显色反应的血清最大稀释度确定抗核抗体的滴度。

当血清稀释比例>1: 64 时仍有显色反应的视为阳性, 有临床意义。

实施例 3

本发明药物组合物的制备

(1) 取患者配偶静脉血 80ml, 加适量肝素 (5000IU) 抗凝。

(2) 将 80ml 静脉血分至 16 个试管, 每个试管 5ml, 每个试管中加入 5ml Ficoll 淋巴细胞分离液 (购自华美公司), 2000 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清, 加入 10ml PBS 缓冲液 (PH7.6) 重悬淋巴细胞。将淋巴细胞悬浮液以 5000 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清。重复此过程 1 次。向淋巴细胞沉淀加入 10ml RPMI-1640 培养液, 转移至细胞培养瓶内, 再加入 10ml 培养液。

(3) 在 37℃±0.5℃、5% CO₂ 恒温箱中培养淋巴细胞 4 天。第三天时向每个培养瓶内加入 40 μg/ml 秋水仙素溶液 0.05 到 0.1ml, 继续培养一天。第四天时将贴壁生长的细胞吹起, 5000 转/分钟离心悬浮液 10 分钟, 弃上清, 留取沉淀的细胞。

(4) 向沉淀的淋巴细胞中加入 5ml 0.06wt% 的 KCl 溶液, 悬浮沉淀的淋巴细胞, 室温静置 30 分钟, 以 10000 转/分钟离心 10 分钟, 弃上清。

(5) 用 5ml PBS 缓冲液 (PH7.6) 洗涤淋巴细胞裂解物 2 次。

(6) 用 5ml PBS 缓冲液 (PH7.6) 重悬淋巴细胞裂解物, 加入 10ml 50%蔗糖分离液, 以 5000 转/分钟离心 10 分钟, 留上清。

(7) 向上清液中加入 10ml 40%蔗糖分离液, 以 5000 转/分钟离心 10 分钟, 保留沉淀。

(8) 用 2 ml PBS 缓冲液 (PH7.6) 洗涤沉淀 2 次。

(9) 用 1ml 生理盐水将 20ml 外周血制得的沉淀制成悬浮液, -20℃ 冷冻保存。每一次免疫治疗用 20ml 配偶血液制成的悬浮液上臂表皮下注射。

5 注意: 所有操作过程及所用试剂均应保持无菌。

实施例 4

治疗病例 1

10 患者就诊时已结婚 5 年。1993 ~ 1995 年间第 1、2 次怀孕均在孕 7 周时行人工流产终止妊娠。1996 年第 3 次怀孕准备生育, 但在孕 8 周时腹痛后阴道出血, B 超提示胎停育, 继而流产。1997 ~ 1998 年间共怀孕两次, 均在孕 7 周时出现阴道血性分泌物。曾用黄体酮中药保胎治疗, 出血停止。孕 10 周时 B 超提示胎停育, 行药物流产, 胚胎相当于 7 周; 1998 年 1 月后至治疗前人工避孕。治疗前按照实施例 2 的方法测定外周
15 血抗核抗体水平为 1: 128。

在 1998 年 9 月 6 日、1998 年 9 月 12 日、1998 年 9 月 25 日和 1998 年 10 月 19 日对患者分别 4 次皮下接种按照实施例 3 的方法利用其配偶染色体制备的本发明药物组合物。前三次接种后皮肤局部反应强度为 +++++, 第四次反应强度为 ++。第四次治疗后经测定患者外周血抗核抗体水平
20 下降至 1: 64。

患者于 1999 年 9 月分娩一个 2800 克重的健康男婴。

实施例 5

治疗病例 2

25 患者就诊时已结婚 4 年。1995 年首次怀孕, 在孕 7 周左右行人工流产终止妊娠。1996 年 8 月第 2 次怀孕, 准备生育, 但在孕 7 周时腹痛后阴道出血, B 超提示胎停育, 继而完全流产。1997 年 1 月和 1997 年 6 月第 3、4 次怀孕, 分别在孕 8 周和孕 7 周时阴道出现血性分泌物, 曾用含黄体酮的中药治疗, 出血停止, 孕 10 周时 B 超提示胎停育, 行药物流产, 胚胎相当于 8 周。1997 年 7 月后人工避孕至就诊时。治疗前按照实

施例2的方法测定, 患者外周血抗核抗体水平为1: 1024。

在1999年6月25日、1999年7月12日、1999年7月28日和1999年8月12日对患者分别进行4次皮下接种利用其配偶染色体按照实施例3的方法制备的本发明药物组合物。前三次接种后皮肤局部反应强度为++++, 第四次反应强度为++。经测定, 第四次治疗后患者外周血抗核抗体水平下降至1: 64。

患者于2000年5月分娩一个3000克重的健康男婴。

实施例6

本发明的药物和方法曾获准在中国多家医院进行临床试用, 共治疗以早期继发 RSA、有人工流产史、外周血特定抗核抗体升高 (>1: 64) 为标准收治的 300 多例病人, 治愈率>95%。除在上臂皮下接种处出现局部红、肿、热、痛等正常治疗反应外, 未发现任何副作用。本发明方法的治疗效果与文献报道的淋巴细胞免疫疗法的结果比较如下。

表 4 本发明免疫疗法与淋巴细胞免疫疗法治疗 RSA 的效果比较

	本发明的免疫疗法	淋巴细胞免疫 ¹⁾	P 值
免疫原	配偶 2 号染色体	配偶淋巴细胞悬液	
病 例	300	21	
妊娠成功	287	13	
妊娠成功率	>95%	62%	<0.01

1) Cauchi MN et al., Am. J. Reprod. Immunol. 1991; 25:16.

权 利 要 求

1、一种用于治疗个体反复自然流产的药物组合物，其特征在于其含有治疗有效量的来自所述个体配偶的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。
5

2、根据权利要求1的药物组合物，其特征在于其含有分离的完整2号染色体。

3、根据权利要求2的药物组合物，其特征在于所述2号染色体是分离自M期体细胞的2号染色体。

10 4、一种用于治疗个体反复自然流产的药物组合物，其特征在于其含有治疗有效量的来自多个男性个体的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段的混合物。

5. 根据权利要求4的药物组合物，其特征在于其含有分离的完整2号染色体。

15 6、根据权利要求5的药物组合物，其特征在于所述2号染色体是分离自M期体细胞的2号染色体。

7、根据权利要求4的药物组合物，其特征在于所述多个男性个体是指3名以上男性个体。

20 8、根据权利要求4的药物组合物，其特征在于所述多个男性个体是指10名以上男性个体。

9、根据权利要求4的药物组合物，其特征在于所述多个男性个体是指20名以上男性个体。

10、作为药物的男性2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

25 11、能够降低体内抗核抗体水平的物质在制备治疗反复自然流产的药物中的应用。

12、权利要求11的应用，其中所述能够降低体内抗核抗体水平的物质是来自男性的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

13、一种治疗个体反复自然流产的方法，其包括给予需要治疗的

个体治疗有效量的能够降低体内抗核抗体水平的物质。

14、根据权利要求13的方法，其中所述能够降低体内抗核抗体水平的物质是来自所述个体配偶的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段。

5 15、根据权利要求14的方法，其特征在于其中给予分离的完整2号染色体。

16、根据权利要求15的方法，其特征在于所述2号染色体是分离自M期体细胞的2号染色体。

(10 17、根据权利要求13的方法，其中所述能够降低体内抗核抗体水平的物质是来自多个男性个体的2号染色体或其含有纤连蛋白编码基因的片段的混合物。

18、根据权利要求17的方法，其特征在于其中给予分离的完整2号染色体的混合物。

15 19、根据权利要求18的方法，其特征在于所述2号染色体是分离自M期体细胞的2号染色体。

20、根据权利要求17的方法，其特征在于所述多个男性个体是指3名以上男性个体。

21、根据权利要求20的方法，其特征在于所述多个男性个体是指10名以上男性个体。

(20 22、根据权利要求21的方法，其特征在于所述多个男性个体是指20名以上男性个体。

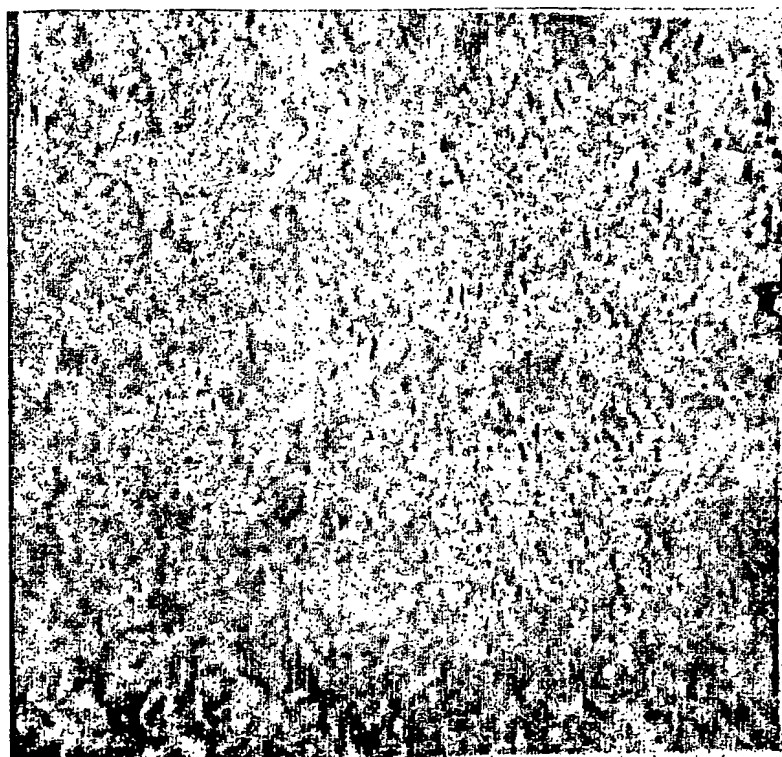


图 1



图 2